OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA
LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

71.

G. LUCHETTI

Influenza dei sali di uranio

sui microbi del suolo e sulle loro funzioni

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa*

Volume VIII - Anno 1932 - X.

PISA: ARTI GRAFICHE PACINI MARIOTTI 1933 - XI

Cav. EMILIO PACINI, Successore

G. LUCHETTI

Influenza dei sali di uranio

sui microbi del suolo e sulle loro funzioni

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa*

Volume VIII - Anno 1932 - X.

PISA: ARTI GRAFICHE PACINI MARIOTTI 1933 - XI

Cav. EMILIO PACINI, Successore

Le prime esperienze sull'influenza che i sali di Uranio esercitano sul plasma vegetale in genere e sul corpo microrganico in specie risalgono al Loew, nel 1887, il quale concluse sulla loro tossicità (1). Nel 1894 Bokorny trovò che il nitrato di Uranile esercita azione relativamente non tossica sui fermenti (2).

Nel 1912 Agulhon e Sazerac (3) estesero le ricerche relative agli effetti dei sali di Uranio sui microrganismi e sperimentarono forme di *Aspergillus niger,* coltivando in liquido Raulin addizionato di nitrato e acetato di Uranile nelle proporzioni di 1 : 5000, 1 : 1000, 1 : 100. Trovarono che, mentre aggiunte pari a 1 : 5000 non determinano alcun sensibile effetto, aggiunte di 1 : 1000 e di 1 : 100 producono rispettivamente effetto stimolante e tossico.

Ne provarono anche gli effetti sulla fermentazione alcoolica, la quale diminuirebbe di intensità per aggiunte al mezzo di 1 : 50.000 dei sali per venire inibita completamente per aggiunte di 1 : 10.000.

Ancora nel 1912 risultati non dissimili circa l'influenza esercitata dai sali di Uranio sulla fermentazione alcoolica comunicava Kayser (4).

Lepierre (5) nel 1913, dopo aver coltivato *Aspergillus niger* in liquido Raulin con aggiunte di sali di Uranio nelle proporzioni comprese tra lo 0,02 e lo 0,00001 %, trovò che lo sviluppo ne è completamente inibito per aggiunta del 0,1%; che le spore si formano ancora per aggiunta di poco inferiore allo 0,01% e che lo 0,02% dà il massimo sviluppo, ma in tal caso non si formano spore.

Javillier nel 1914 (6), trovò che l'Uranio non può sostituire lo Zinco nella nutrizione dell'*Asp. niger*.

Stoklasa e Pénkava, cui si devono le ultime esperienze sull'argomento, nel 1918 accertarono (7) che il nitrato di Uranile eserciterebbe un'azione stimolante sulla fissazione microbica dell'azoto elementare, specialmente in presenza di ossigeno; ma non sulla formazione di ammoniaca per opera del *Bac. vulgatus*, nè sui processi riduttivi dei nitrati. Secondo Stoklasa e Pénkava l'Uranio eserciterebbe la sua influenza a mezzo di raggi α, β, γ : i primi stimolerebbero i processi ossidativi, gli altri i processi riduttivi.

PARTE SPERIMENTALE.

1. — *Influenza sullo sviluppo dei microbi del suolo.*

Al seguente liquido colturale:

acqua	1000
solfato ammonico	2
saccarosio	20

cloruro ferrico	0,2
solfato potassico	tr.
cloruro sodico	

si aggiunse nitrato e acetato di Uranile in quantità equimolecolari e in diverse proporzioni comprese tra 1 : 1.000 e 1 : 1.000.000 (considerati come U elemento), dopo averne distribuiti 200 cc. in beute da 500 cc. In alcune beute (di controllo) i sali non furono aggiunti. In tutte fu inoculato 1/2 cc. dello stemperamento in acqua, a parti uguali, di buona terra di giardino. Si coltivò a 24° C. contando, al V e X giorno, le colonie sviluppatisi su piastre allestite all'agar-fagiuoli e seminate con 1 cc. di coltura.

		Migliaia di germi per 1 cc. di coltura al V giorno	X giorno
CONTROLLO		26	124
NITRATO	1 : 1.000	4	44
	1 : 5.000	70	81
	1 : 10.000	80	175
	1 : 50.000	150	350
	1 : 100.000	340	380
	1 : 500.000	400	410
	1 : 1.000.000	360	395
ACETATO	1 : 1.000	4	33
	1 : 5.000	10	67
	1 : 10.000	20	124
	1 : 50.000	60	185
	1 : 100.000	78	233
	1 : 500.000	124	327
	1 : 1.000.000	190	370

L'effetto stimolante dei sali in esame risultò evidente fino dal V giorno di coltura per le concentrazioni inferiori al

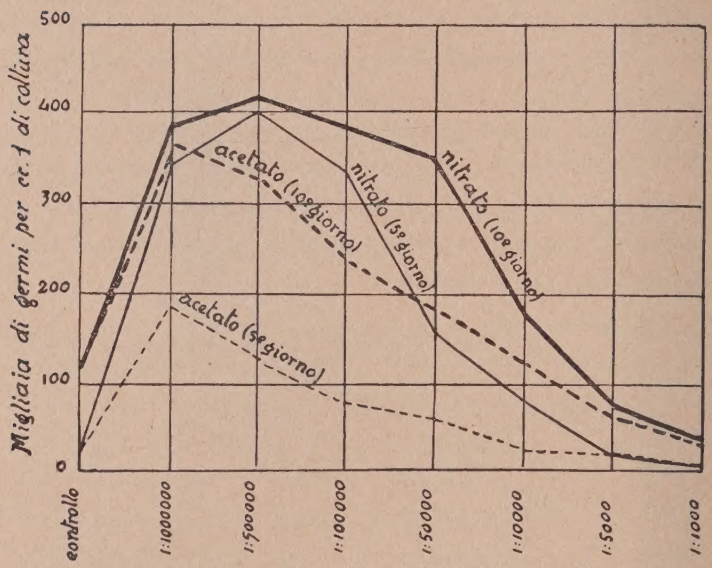

Fig. 1. — *Diagramma dello sviluppo microrganico in presenza di varie concentrazioni di nitrato e acetato di Uranile.*

1:10.000, mentre risultò azione tossica per le concentrazioni superiori. L'effetto stimolante si dimostrò inversamente proporzionale alle concentrazioni e, a parità di concentrazione, maggiore per il nitrato che per l'acetato.

2. — *Influenza sulla produzione di CO_2.*

Per tale esperienza si addottò un dispositivo costituito da una beuta da 500 cc. contenente 250 cc. del seguente liquido colturale:

acqua distillata	1000
glucosio	40
peptone	1

inoculato con 25 grammi di buona terra di giardino. La beuta era chiusa con tappo di gomma a due fori, da uno dei quali penetrava una canna di vetro che giungeva fino al fondo del recipiente di coltura ed era collegata all'estremità opposta con una bottiglia di lavaggio contenente KOH al 10% ; dall'altro foro del tappo usciva una corta canna di vetro collegata ad un tubo ad U contenente Ca Cl_2 e tale tubo era a sua volta collegato ad un tubo a tre bolle (Bolla di Liebig) contenente KOH al 10%.

Al principio dell'esperienza si innestava il tubo di gomma di un vuotometro direttamente al tubo di vetro più corto della beuta, disinnestandone prima il tubo ad U, e si faceva passare per circa 30′ una corrente d'aria, prima attraverso la bottiglia di lavaggio, poi al recipiente di coltura, in modo da esportare da questo tutta l'aria confinatavi, sostituendola con aria decarbonicata; dopo di che si innestava il tubo ad U al suo posto e si collegava a questo la bolla di Liebig previamente riempita e pesata esattamente. Al termine dell'esperienza (dopo 7 giorni di colltura a 24° C.) si innestava il tubo della pompa direttamente alla bolla di Liebig e si faceva passare una corrente d'aria (sempre per 30′) attraverso: *a*) la bottiglia di lavaggio, *b*) la beuta, *c*) il tubo a $CaCl_2$, *d*) la bolla di

Liebig. Ciò allo scopo di asportare dal recipiente di coltura tutta la CO_2 prodotta dalla fermentazione del glucosio, liberarla dall'umidità attraverso il cloruro di Calcio e farla assorbire dalla KOH della bolla. Terminata l'operazione si ripesava esattamente la bolla e dall'aumento di peso si desumeva la quantità di CO_2 prodotta in quelle condizioni ed in quella quantità di liquido colturale.

Avendo a disposizione solo tre apparecchi del tipo sopra descritto fu ripetuta l'esperienza per 7 volte, sperimentando ciascuna volta su nitrato ed acetato di Uranio ad una data concentrazione e lasciando il terzo apparecchio di controllo, cioè, con liquido colturale non addizionato di sali di Uranio.

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati delle esperienze. Perchè meglio possa intendersi il valore dell'influenza dei sali di Uranio sulla fermentazione dei carboidrati si sono riportati anche i valori delle quantità di CO_2 prodotta rispetto al controllo fatto uguale ad 1. Perchè, inutile dirlo, i risultati dei controlli non furono sempre gli stessi.

Quantità di CO_2 prodotta dopo 7 giorni di coltura:

Controllo	Concentraz.	Nitrato	Acetato
0,3566	1/1.000	0,2849	0,1451
0,4875	1/5.000	0,5428	0,9176
0,6171	1/10.000	0,7323	0,8420
1,0818	1/50.000	1,0824	?
0,6954	1/100.000	0,4816	0,3812
0,8680	1/500.000	0,8738	1,3836
0,4400	1/1.000.000	0,4536	0,4521

Incrementi di CO_2 rispetto al controllo:

Concentrazioni	Nitrato	Acetato
1/1.000	— 0,0717	— 0,2115
1/5.000	+ 0,0553	+ 0,4301
1/10.000	+ 0,1152	+ 0,2249
1/50.000	+ 0,0006	?
1/100.000	— 0,2138	— 0,3142
1/500.000	+ 0,0058	+ 0,5256
1/1.000.000	+ 0,0136	+ 0,0121

Quantità di CO_2 prodotta, riportata al valore 1 del controllo:

Concentrazioni	Nitrato	Acetato
1/1.000	0,7989	0,4069
1/5.000	1,1157	1,8861
1/10.000	1,1868	1,3645
1/50.000	1,0006	?
1/100.000	0,6935	0,5489
1/500.000	1,0068	1,5942
1/1.000.000	1,0309	1,0275

La produzione di CO_2 diminuì, rispetto al controllo, nelle colture contenenti i sali nelle proporzioni di 1/1.000; quindi aumentò, ora più ora meno, per diluizioni crescenti, fino a quella di 1/1.000.000, diminuendo solo dove i sali furono aggiunti nelle proporzioni di 1/100.000. Questa diminuzione non

si vede in qual modo si determini, come apparentemente sembra strano che gli incrementi di produzione non siano affatto costanti. La causa di ciò deve,forse, ricercarsi nella precipitazione parziale o totale del metallo ad opera delle sostanze, molte di natura colloide, presenti nel materiale d'inoculazione e del peptone aggiunto al liquido di coltura. Tale precipitazione deve di per sè influire sullo svolgersi del processo tanto da mascherare i risultati finali, rendendoli non proporzionalmente correlazionabili ai fatti che dovrebbero determinarli.

A questo punto anzi è bene notare che l'intensità del processo di fermentazione si mostrò favorevolmente influenzata dall'aggiunta di sali di Uranio, nonostante nei liquidi che lo contenevano si venisse necessariamente ad avere notevole diminuzione di peptone e di sostanza organica in genere, ciò che doveva invece ostacolare il processo stesso. Di questo si tratterà più ampiamente a proposito della formazione di ammoniaca.

Ad ogni modo, l'aumento di produzione di CO_2 risultò evidente: e non poteva essere a meno, per l'aumento del numero di germi che si verifica nelle colture con Uranio.

3. — *Influenza sul processo di ammonizzazione.*

Si fece uso di piccole Erlenmeyer contenenti cc. 50 di soluzione all'1,5 % di Peptone Witte, con o senza aggiunta di sali di Uranio, che si inocularono con cc. 5 di stemperamento 1 : 1=terra : acqua.

Si coltivò a 24° C. per quattro giorni, al termine dei quali fu distillata l'ammoniaca prodotta, su ossido di Magnesio.

		Ammoniaca prodotta per litro di soluzione grammi: (1)
Controllo		1,4680
NITRATO	1/1.000	0,1806
	1/5.000	0,1942
	1/10.000	0,5474
	1/50.000	0,6304
	1/100.000	0,9843
	1/500.000	1,2597
	1/1.000.000	1,3092
ACETATO	1/1.000	0,1445
	1/5.000	0,3400
	1/10.000	0,3743
	1/50.000	0,8331
	1/100.000	0,8891
	1/500.000	1,2752
	1/1.000.000	1,4620

La quantità di ammoniaca prodotta fu in ogni caso inferiore al controllo e i risultati ottenuti collimano con quelli di Stoklasa e Pénkava.

La ragione del fatto sarebbe da ricercarsi nella natura del metallo in esame, che, essendo molto pesante, anzi il più pesante di tutti i metalli, (p. a. 238,5) funziona da elettrolita sui colloidi. Ciò si è anche constatato nell'allestimento delle Erlenmeyer per l'ammonizzazione: in tutte (eccettuate quelle

(1) Media di quattro determinazioni.

di controllo) si verificava la formazione di fiocchi biancastri all'atto dell'aggiunta dei sali di Uranio, flocculazione dovuta appunto alla gelificazione del peptone. Sotto tale forma si ritrovava ancora il peptone all'atto della distillazione. Segno

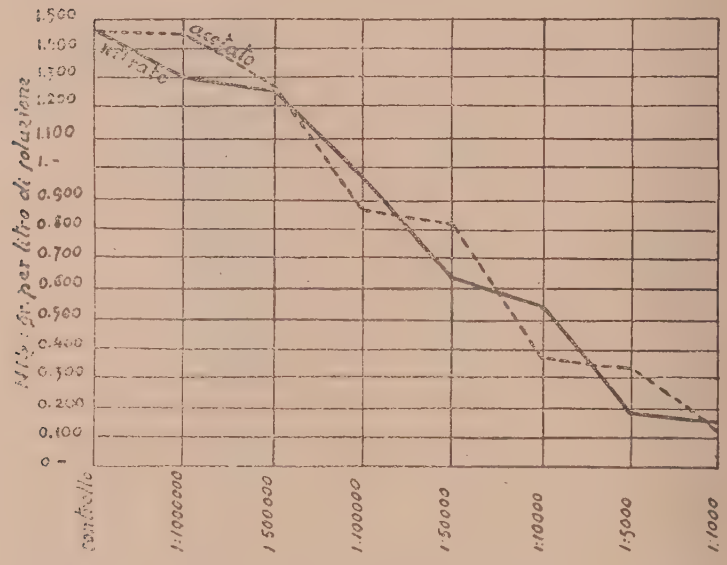

Fig. 2. — *Diagramma del processo di ammonizzazione in presenza di nitrato e acetato di Uranile.*

evidente che l'azione microrganica ammonizzante ha poco o punto effetto sul peptone in tale stato.

Di qui trovò origine la convinzione che non la tossicità dei sali di Uranio, ma la presenza del peptone allo stato di gelo impedisse la formazione di ammoniaca nelle colture in esperimento. Ne è conferma il fatto che concentrazioni minime di sali di Uranio impedirono, nelle colture che le conte-

nevano, di raggiungere l'intensità del processo ammonizzante verificatosi nel controllo, mentre si vide che agivano ben favorevolmente sullo sviluppo microbico.

4. — *Influenza sul processo di nitrificazione.*

Furono determinati i nitrati formatisi da una soluzione di solfato ammonico (liquido di Omelianski), addizionata o meno dei sali in esame, dopo averla inoculata con gr. 1 di terra e coltivata in termostato a 24° C. per 25 giorni.

Grammi di HNO_3 per litro di soluzione: (1)

Nitrato di Uranio		Acetato di Uranio	
Controllo	0,0016	Controllo	0,0050
1/1.000	———	1/1.000	———
1/5.000	0,0960	1/5.000	0,0087
1/10.000	0,0114	1/10.000	0,0150
1/50.000	0,0096	1/50.000	0,0200
1/100.000	0,0033	1/100.000	0,0300
1/500.000	0,0023	1/500.000	0,0400
1/1.000.000	0,0022	1/1.000.000	0,0400

Essendo stata eseguita l'esperienza in due tempi successivi, con due serie di Erlenmeyer e ripetendo il controllo, per il nitrato e l'acetato di Uranile si riportano nella seguente tabella i valori delle quantità di HNO_3 trovate, ponendo, per comodità di raffronto delle azioni esercitate dai due composti, i valori del controllo uguali all'unità.

(1) Media di quattro determinazioni.

Controllo	1,0000	1,0000
Uranio	Nitrato	Acetato
1/1.000	———	———
1/5.000	60.0000	1,7400
1/10.000	7,1250	3,——
1/50.000	6,——	4,——
1/1.00.000	2,0625	16,——
1/500.000	1,4375	8,——
1/1.000.000	1,3750	8,——

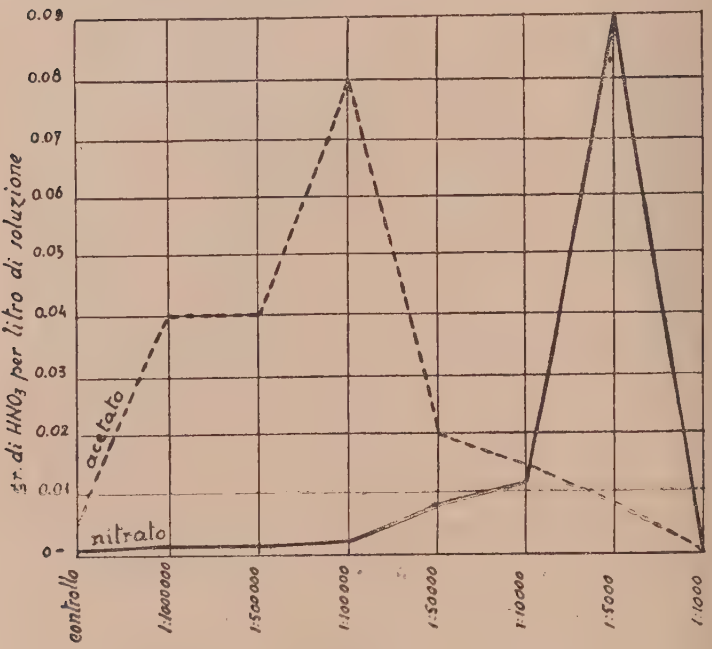

Fig. 3. — *Diagramma del processo di nitrificazione in presenza di nitrato e acetato di Uranile.*

Eccetto la concentrazione di 1/1.000, qualsiasi altra aggiunta di sali di Uranio favorisce il processo di nitrificazione; specialmente l'acetato di Uranile agisce anche in piccole dosi, di cui la più acconcia si dimostrò essere quella di 1/100.000 mentre il nitrato esplica il suo massimo effetto nella dose di 1/5.000.

Inutile dire che ai risultati ottenuti con aggiunte di nitrato fu detratta la quantità di HNO_3 introdotto nel liquido insieme al metallo.

5. —*Influenza sul processo di denitrificazione.*

La diversa influenza esercitata dai sali di Uranio sulla riduzione microbica dei nitrati fu determinata valutando le ore necessarie alla scomparsa dei nitrati da 50 cc. di soluzione di Giltay inoculata con cc. 10 di stemperamento 1:1=terra: acqua, e coltivata in termostato a 24° C.

	Ore necessarie alla scomparsa dei nitrati dal liquido di Giltay (1)	
Concentrazioni Uranio	Nitrato	Acetato
Controllo	48	46
1/1.000	48	57
1/5.000	54	61
1/10.000	24	24
1/50.000	34	28
1/100.000	27	34
1/500.000	45	41
1/1.000.000	24	26

(1) Media di tre determinazioni.

Quando più, quando meno, il processo di denitrificazione si mostrò stimolato per aggiunta di sali di Uranio, se si eccettuino le concentrazioni di 1/1.000 e 1/5.000.

Dall'esame delle cifre l'azione stimolante sembrerebbe dovuta più alla presenza che alla quantità di metallo aggiunto e ciò è verosimile sia, in quanto le diverse dosi dovevano ben

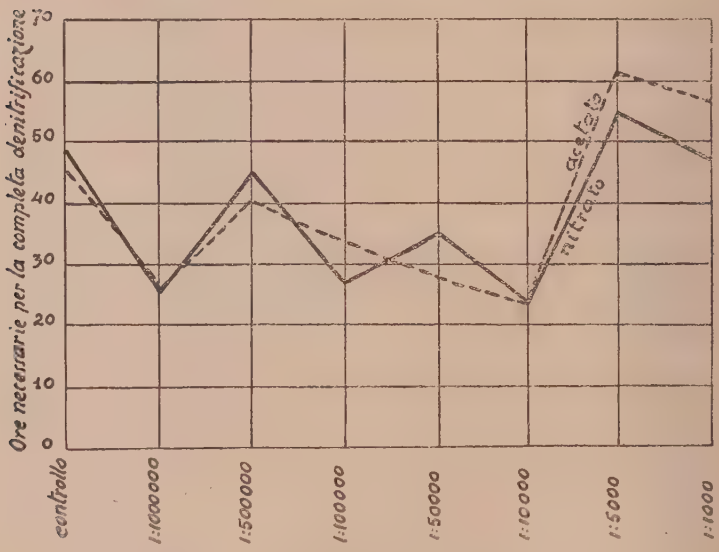

Fig. 4. — *Diagramma del processo di denitrificazione in presenza di nitrato e acetato di Uranile.*

poco influire determinandosi in seno al liquido la precipitazione del metallo stesso.

6. — *Influenza sul processo di azotofissazione.*

Stoklasa e Penkava trovarono che il nitrato di Uranio stimola in determinate condizioni (piccole concentrazioni) la fis-

sazione di Azoto elementare. Questo, ugualmente noi abbiamo potuto confermare, mentre non chiara ci è apparsa l'influenza dell'acetato.

Infatti:

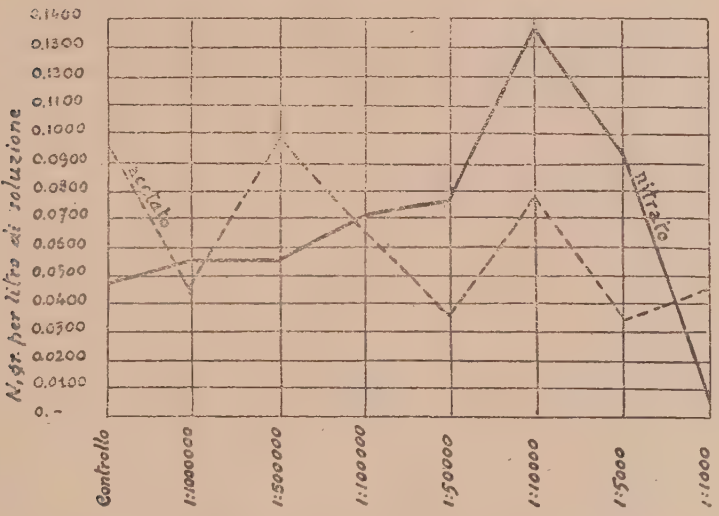

Fig. 5. — *Diagramma del processo di azotofissazione in presenza di nitrato e acetato di Uranile.*

Concentrazioni Uranio	Grammi di *N* per litro di soluzione: Nitrato (1)	Acetato
1/1.000	0,0048	0,0439
1/5.000	0,0936	0,0349
1/10.000	0,1359	0,0775
1/50.000	0,0768	0,0355

(1) Dai risultati di questa colonna furono detratte le quantità di *N* introdotto col metallo.

1/100.000	0,0702	0,0641
1/500.000	0,0555	0,0982
1/1.000.000	0,0550	0,0439
Controllo	0,0495	0,0943

Qui come altrove, essendosi l'esperienza compiuta in due serie distinte per i due sali, riportiamo i risultati in modo da renderli comparabili, cioè, ponendo i controlli uguali ad 1.

Controllo	1,00	1,00
Concentrazioni Uranio	Nitrato (1)	Acetato
1/1.000	0,0969	0,4655
1/5.000	1,8909	0,3701
1/10.000	2,7454	0,8218
1/50.000	1,5515	0,3765
1/100.000	1,4182	0,6797
1/500.000	1,1212	1,0414
1/1.000.000	1,1111	0,4655

7. — *Influenza sullo sviluppo di alcuni Funghi.*

Dopo aver sperimentato l'azione dei due composti di Uranio sullo sviluppo e sulle funzioni dei microbi del suolo, si volle studiarne anche l'effetto sullo sviluppo di alcune forme fungine coltivate in coltura pura.

Il presente studio si limitò alle quattro forme seguenti: *Asp. niger, Asp. varians, Macr. comune, Botr. cinerea.*

(1) Dai risultati di questa colonna furono detratte le quantità di *N* introdotto col metallo.

Si coltivano i Funghi in liquido di Raulin, dalla cui composizione si eliminò la sorgente alimentare fosforata (1) perchè, come è noto, il Fosforo precipita l'Uranio quantitativamente. Lo stesso si era fatto per tutti i liquidi colturali dei quali si è parlato più indietro. Le colture si fecero con o senza (controlli) aggiunte di sali di Uranio nelle concentrazioni ormai note.

I risultati ottenuti con la coltura dei Funghi prolungata per 30 giorni furono i seguenti:

I. — *Aspergillus niger* = Sviluppo scarso in tutte le Erlenmeyer contenenti Uranio, ma più scarso ancora nel controllo; sviluppo nullo nelle concentrazioni di 1/1.00 sia di nitrato che di acetato. Lo sviluppo maggiore si ebbe con nitrato 1/10.000.

II. — *Aspergillus varians* = Sviluppo scarso in tutte le colture (compreso il controllo); nelle colture con nitrato lo sviluppo fu sempre superiore al controllo, anche se di poco; in quelle con acetato si ebbe un massimo di sviluppo con la concentrazione di 1/1.000.000, un minimo con 1/1.000; e nelle concentrazioni intermedie lo sviluppo si mantenne sensibilmente uguale a quello del controllo. Fra tutti i Funghi sperimentati fu l'unico dimostratosi capace di sviluppare con 1/1.000 di Uranio meglio che nel controllo laddove gli altri non si svilupparono affatto.

III. — *Botrytis cinerea* = Sviluppo scarso in tutte le beute con Uranio. In quelle contenenti nitrato lo sviluppo maggiore si ebbe con la concentrazione 1 : 5.000; nullo lo sviluppo

(1) Questo portò ad uno sviluppo ridotto, ma comunque di valore relativo nei diversi casi confrontati fra loro.

delle colture con 1 : 1.000, sia di nitrato che di acetato. Il controllo, invece, si mostrò sviluppatissimo, con feltro spesso ed abbondante.

IV. — *Macrosporium commune* = Sia nelle colture con nitrato che in quelle con acetato si toccò il massimo di sviluppo con le concentrazioni di 1/100.000. A parità di concentrazione però lo sviluppo fu sempre leggermente superiore nelle colture con nitrato. Rispetto al controllo lo sviluppo fu sempre inferiore, se si eccettuino le colture con concentrazione di 1/100.000.

A meglio chiarire i risultati si riporta la tabella seguente, in cui lo sviluppo è indicato per mezzo di una scala numerica che va dallo zero al 5, con i significati:

0 = Sviluppo nullo.

1 = Presenza, nel liquido di coltura, di piccole quantità di feltro, sparse in superficie o in profondità.

2 = Presenza di quantità un po' maggiori di feltro, ma sempre in piccoli pezzi di non più di 2 cm. di diametro.

3 = Feltro occupante più di metà della superficie del liquido.

4 = » » quasi tutta la superficie del liquido, ma di limitato spessore oppure non continuo.

5 = Feltro di forte spessore, continuo, occupante la superficie massima possibile.

FUNGO		CONCENTRAZIONI							
		1.000	5.000	10.000	50.000	100.000	500.000	1.000.000	Controllo
Asp. niger	Nitrato	0	1	3	2	2	2	2	1
	Acetato	0	1	2	2	2	2	2	
« *varians*	Nitrato	3	4	3	3	2	3	3	2
	Acetato	1	5	2	2	2	2	3	
Botr. ciner.	Nitrato	0	3	2	1	1	1	1	5
	Acetato	0	1	2	2	2	2	2	
Macr. comm.	Ni trat	0	1	2	2	4	2	1	3
	Acetato	0	1	2	2	3	2	1	

CONCLUSIONI.

Le ricerche di cui si è riferito sopra completano e confermano le indagini sull'argomento di Stoklasa e Penkava.

Da esse si può dedurre che i sali di Uranio sperimentati (nitrato e acetato), in piccole concentrazioni, stimolano lo sviluppo dei microbi del suolo, favoriscono la fermentazione dei carboidrati, la formazione dei nitrati e la fissazione dell'Azoto atmosferico. Riguardo all'azione deprimente sull'ammonizzazione sarebbe azzardato dire se ciò sia dovuto ad azione del metallo sui microbi ammonizzanti o non piuttosto, come si deve ritenere più verosimile, alla modificazione nel mezzo di coltura della materia prima (peptone) richiesta per la formazione di NH_3. La denitrificazione è anch'essa favorita dall'Uranio.

Sullo sviluppo dei Funghi l'Uranio agisce in modo diverso da specie a specie; così mentre alcuni Funghi tollerano bene, anzi si giovano di forti concentrazioni di Uranio (*Asp. varians* = 1/1.000), altri prosperano bene soltanto in liquidi a concentrazione ridotta, risentendone effetto stimolante (*Asp. niger* e *Macr. commune*), altri, infine, sono molto sfavorevolmente influenzati dalla presenza del metallo nel liquido di coltura anche in quantità minime (*Botrytis cinerea*).

Dal Laboratorio di Batteriologia
del R. Istituto Superiore Agrario
Pisa, novembre 1932 - XI

NOTE.

(1) Loew O. — *Ueber Giftwirkung* — Arch. Physiol. (Pflüger), *40* 437-447, 1887.

(2) Bokorny t. — *Toxicologische Notizien ueber einige Verbindungen des Tellur, Wolfram, Cer, Thorium.* Chem. Ztg., *18*, 1759, 1894

(3) Agulhon H. e Sazerac R. — *De l' action de l' Uranium sur certains microrganismes.* Bul. Soc. Chim., 4. Sèrie *11*, 868-872, 1912

(4) Kaiser E. — *Influence des sels d' Urane sur les ferments alcooliques.* C. R. Ac., *151, 816;* 1912

(5) Lepierre C. — *Sur la non spécificité du zinc comme catalyseur biologique pour la culture de l' Asp. niger. Son remplacement par d' autres élèments.* C. R. Sc. *156*, 258-261; 1913

(6) Javillier M. — *Sur la culture de l' Asp. niger dans le millieu où le zinc est remplacé par divers éléments chimiques (Cuivre, Uranium, Vanadium).* Bul. Soc Chim. Biol. *1*, 55-57; 1914

(7) Confr. Buchanan R. E. e Fulmer E. J. — *Physiology and Biochemistry of. Bacteria.* Vol. II. 1930.